

Dobre i złe strony tlenu azotu

Maria Sokołowska i Lidia Włodek

Instytut Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Wprowadzenie

Tlenek azotu zaczął wzbudzać zainteresowanie ekologów i specjalistów od spraw motoryzacji w latach 50. w Stanach Zjednoczonych, a następnie u schyłku lat 70. naszego wieku w Europie, z uwagi na znaczną jego zawartość w emitowanych spalinach i zanieczyszczeniach przemysłowych. Znacznie wcześniej obserwowano zjawisko tzw. smogu, czyli ciemnej chmury stanowiącej skupienie par i pyłu. Opadanie jej w postaci mgły było przyczyną zatruć, a nawet śmierci wielu osób (Francja w 1930 r., Stany Zjednoczone w 1948 r., Wielka Brytania w 1952 r.). Bliższa analiza tego zjawiska wykazała, że w chmurze lub pod nią gromadzą się trujące gazy, a wśród nich tlenek azotu [1].

Na polu medycznym tlenek azotu skupił uwagę uczonych w aspekcie badań nad relaksacją mięśni gładkich naczyń krwionośnych pod wpływem acetylocholino, bradykininy i nukleotydów adeninowych oraz innych substancji, powodujących uwolnienie z komórek śródbłonka naczyń krwionośnych tzw. EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) [2, 3]. Czynniki te, powodujące aktywację rozpuszczalnej cyklazy guanylowej oraz wywołujące relaksację naczyń krwionośnych, okazał się tlenkiem azotu [4, 5].

Tlenek azotu (NO) jest produkowany w organizmach zwierząt przez 3 odrębne formy syntazy tlenu azotu (NOS) — dwie konstytutywne: neuronalną (nNOS — NOS I) i śródbłonkową (eNOS — NOS III), zależne od jonów wapnia i stymulowane za pośrednictwem kalmoduliny [6], oraz tzw. formę indukowaną (iNOS — NOS II), głównie stymulowaną przez cytokiny i lipopolisacharydy. Ta forma enzymu wykazuje tak silne powinowactwo do związanej z nią kalmoduliny, że pozostaje w pełni aktywna nawet przy najniższych fizjologicznych stężeniach Ca^{2+} .

Dotychczas prowadzone podstawowe badania dotyczące tlenu azotu wiązały się przede wszystkim z medycyną kliniczną. Niedobór tego związku występuje w licznych schorzeniach układów: sercowo-naczyniowego, żołądkowo-jelitowego, moczowo-płciowego oraz oddechowego [7]. W pewnych warunkach nadmierna ekspresja syntazy NOS, a dokładnie jej formy indukowanej (iNOS), może okazać się dla organizmu niekorzystna, co ma miejsce we wstrząsie septycznym. Ciągła ekspozycja komórek na wysokie stężenie NO może mieć działanie cytotoksyczne, prowadzące do uszkodzenia wielu narządów [7]. Losy metaboliczne przemian NO w zdrowym organizmie zależą od miejsca jego powstawania, a także od możliwości magazynowania lub też postaci, w jakiej podaje się go w celach farmakologicznych. W nieobecności hemoglobiny (która wychwytuje i wiąże NO) dyfunduje on szybko wzdłuż naczyń krwionośnych i dociera do naczyń mięśni gładkich w ilościach zapewniających prawidłowe funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego [8].

Udział tlenu azotu w regulacji przepływu i ciśnienia krwi

Tlenek azotu w warunkach fizjologicznych powstaje w komórkach śródbłonka z udziałem śródbłonkowej syntazy NO (eNOS); oddziałując na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, pełni rolę regulatora przepływu i ciśnienia krwi [6, 7]. Wiadomo, że sygnałem uruchamiającym skurcz mięśni gładkich jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Powstający w tych warunkach kompleks Ca^{2+} -kalmodulina aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny (LM), w wyniku czego następuje ich fosforylacja, prowadząca do aktywacji miozyny i do zamiany energii chemicznej, związanej z hydrolizą ATP na energię mechaniczną skurczu mięśni gładkich. Inicjacja skurczu następuje na skutek utworzenia kompleksu aktyny z miozyną [9]. Tlenek azotu, działając za pośrednictwem cGMP, zwiększa aktywność fosfatazy hydrolizującej ufosforylo-

Adres do korespondencji: Dr hab. farm. Lidia Włodek
Instytut Biochemii Lekarskiej CM UJ
ul. Kopernika 7, 31–034 Kraków
Nadesłano: 24.04.2001 r. Przyjęto do druku: 28.06.2001 r.

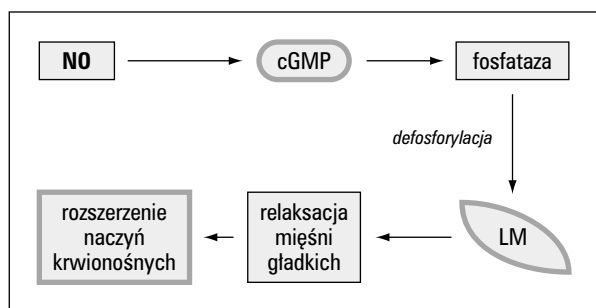
waną miozynę. Defosforylacja łańcuchów regulatorem miozyny powoduje ich inaktywację, zahamowanie oddziaływania z aktyną, a w konsekwencji rozkurcz mięśni (ryc. 1). Ponadto proces ten obniża wrażliwość mięśni gładkich na jony wapniowe [9, 10]. Tlenek azotu zwiększa również aktywność zależnych od wapnia kanałów potasowych zarówno z udziałem, jak i bez udziału cGMP [9–12]. Otwarcie kanałów potasowych powoduje hiperpolaryzację membrany komórkowej i zmniejszenie aktywności zależnych od napięcia kanałów wapniowych [9, 10], w wyniku czego następuje zmniejszenie dopływu jonów wapnia do komórek naczyniowych mięśni gładkich. Obniżenie stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu stabilizuje relaksację mięśni gładkich.

Na wytwarzanie NO mają także wpływ takie czynniki fizjologiczne jak naprężenie ścinające. Chronicznie podwyższone w wyniku systematycznego treningu fizycznego naprężenie ścinające wywołuje, poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, ekspresję eNOS, a w konsekwencji rozszerzenie naczyń krwionośnych [11]. Naprężenie ścinające stymuluje również uwalnianie NO w hodowli komórek śródbłonna aorty, podwyższając tym samym przepływ cieczy przez warstwę komórek śródbłonna [13]. Zwiększenie przepuszczalności obserwuje się również w przypadku zastosowania inhibitora glikolizy — jodooctanu, natomiast dodatek dibutyrylo-cAMP odwraca ten efekt, co wskazuje na udział cyklicznego AMP (cAMP) w tym procesie. Istotnie, w wyniku hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfo-glicerynowego przez zwięks-

szone stężenie NO, następuje spadek poziomu ATP i cAMP i podwyższenie przepuszczalności warstwy komórek śródbłonna [13]. Ponieważ jednak specyficzny inhibitor glikolizy — 2-dezoksyglukoza — nie wpływa na przepływ, podważa to znaczenie drogi metabolicznej w tym procesie i sugeruje alternatywny mechanizm stymulacji przepuszczalności przez NO, wrażliwy na jodooctan [13].

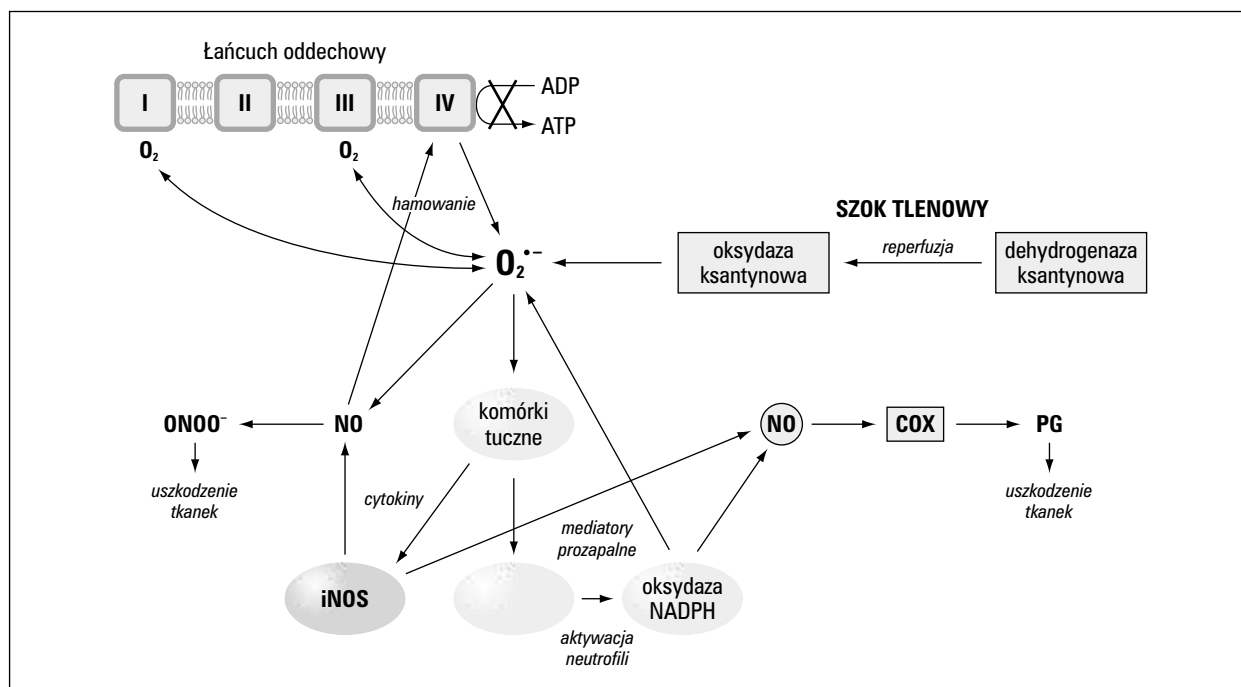
We wczesnym stadium rozwoju patologii nadciśnienia i miażdżycy tętnic obserwuje się zmniejszenie aktywności rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej zależnej od NO [14]. Pozytywne działanie NO w regulacji przepływu krwi zaznacza się w momencie nagłego rozszerzenia się naczyń krwionośnych i gwałtownego wzrostu przepływu krwi tętniczej, kiedy następuje turbulencja, która poprzez naprężenie ścinające może wywoływać skurcz mięśni gładkich. Zwiększenie naprężenia ścinającego, będące konsekwencją kurczenia się naczyń krwionośnych, powoduje wydzielanie NO przez komórki śródbłonna, co prowadzi do rozkurczu mięśni i przywrócenia normalnego przepływu krwi [6]. Modulacja przepływu krwi poprzez zwiększenie produkcji NO ma na ogół pozytywne znaczenie, gdyż powoduje wzrost szybkości transportu śródbłonkowego, a więc zaopatrywania komórek w niezbędne składniki [13]. Tlenek azotu hamuje również agregację płytek i leukocytów oraz adhezję do powierzchni komórek śródbłonna [5, 7].

W warunkach patologicznych, takich jak stany zapalne, tlenek azotu powstaje z udziałem indukowanej odmiany syntazy NO (iNOS) w sposób ciągły przez wiele godzin, a nawet dni [15]. Konsekwencją tego procesu jest nadmierna aktywacja cyklooksygenazy (COX) (ryc. 2, 3), co może prowadzić do powstawania dużych ilości prozapalnych prostaglandyn, a także reaktywnych form tlenu [11, 16]. W tej sytuacji może następować nadmierne rozszerzenie naczyń krwionośnych. Pojawił się również pogląd przeciwny — na temat możliwego hamującego wpływu NO na aktywność COX, co zaobserwowano w makrofagach mysich linii J774, komórkach Kupfera oraz w makrofagach otrzewnowych szczurów [15]. Ponieważ jednak dodatek egzogennych donorów tlenu azotu odwracał ten efekt, obserwacje te poddaje się w wątpliwość [16]. Zjawiskiem ubocznym, towarzyszącym nadmiernemu rozszerzeniu naczyń krwionośnych pod wpływem NO, jest ich zwiększona przepuszczalność dla albumin oraz związana z tym możliwość występowania obrzęków [13, 14]. Wpływ NO na przepuszczalność śródbłonna nie jest jednoznaczny, ponieważ występuje tylko w dużych tętniczkach, w których opór hydrauliczny i naprężenie ścinające są wyraźniejsze [6].



Ryc. 1. Udział NO w regulacji przepływu krwi. Tlenek azotu aktywuje zależną od cGMP fosfatazę, powodując defosforylację lekkich łańcuchów miozyny (LM), dzięki czemu następuje relaksacja mięśni gładkich i rozszerzenie naczyń krwionośnych.

Fig. 1. Nitric oxide participation in the blood flow regulation. Nitric oxide activates cGMP-dependent phosphatase resulting in dephosphorylation of light myosin chains (LM) and then smooth muscle relaxation and vasodilation.



Ryc. 2. Udział NO w procesie niedokrwienia i reperfuzji. Reaktywne formy tlenu ($O_2^{\bullet-}$) powstające w procesie reperfuzji uwalniają z komórek tłuszczowych cytokiny, które aktywują iNOS. Tworzący się w tych warunkach NO powoduje zahamowanie przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym i dodatkową produkcję $O_2^{\bullet-}$ i nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) oraz prostaglandyn (PG), przez co przyczynia się do uszkodzenia tkanek. Infiltracja neutrofilów dodatkowo pogłębia ten proces.

Fig. 2. Nitric oxide participation in ischemia-reperfusion. Reactive oxygen species (ROS) that appear in reperfusion cause mast cell degranulation and cytokine releasing, what activates iNOS. NO produced in such conditions inhibit respiration chain electron flow, and result in additional production of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), peroxynitrite ($ONOO^-$) and prostaglandins (PG), thus contributing to tissue damage. Neutrophil infiltration intensifies this process.

Nadmierna produkcja NO, np. podczas wstrząsu septycznego, może również wywołać nadmierny spadek ciśnienia krwi, niewydolność serca oraz zmniejszoną wrażliwość na substancje naczyniowo aktywne [17]. Zwiększoną produkcję tlenu azotu obserwuje się również podczas dializy u wykazujących niedociśnienie pacjentów z niewydolnością nerek [18]. Sugestia, że mogłoby to się wiązać z indukcją eNOS przez membrany dializacyjne, nie znalazły jednak potwierdzenia [18].

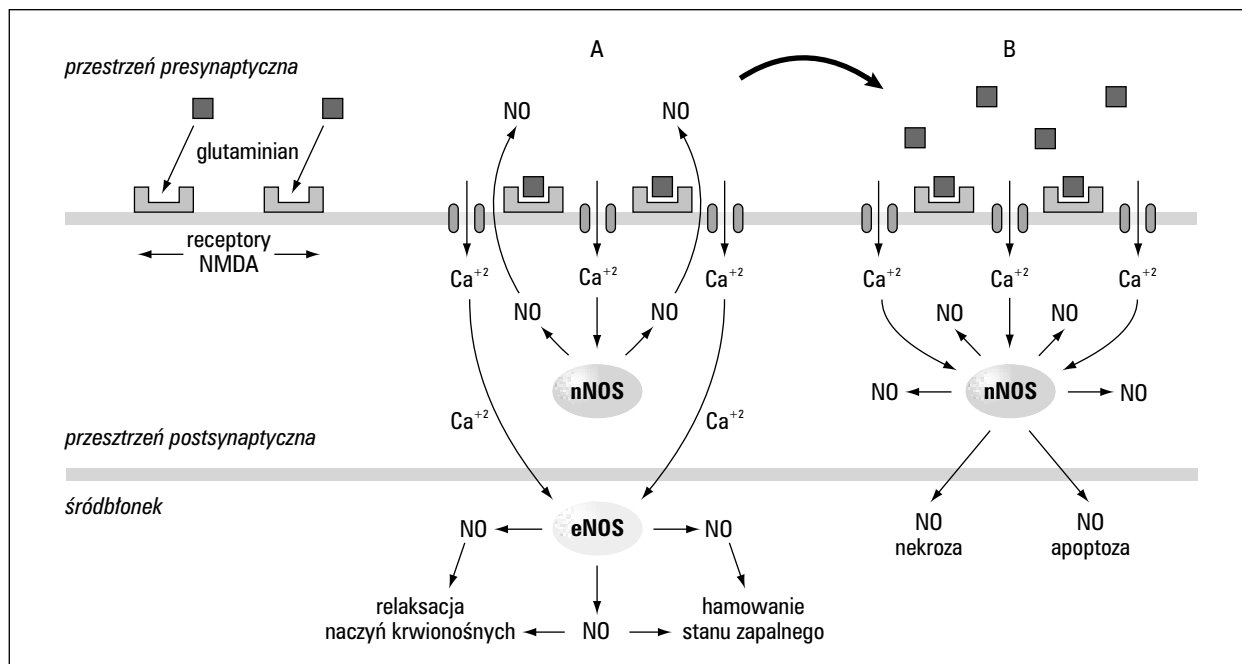
Terapeutyczne znaczenie tlenu azotu i jego egzogennych prekursorów

Zdolność rozszerzania naczyń krwionośnych przez NO i takie jego prekursory, jak nitrogliceryna i inne organiczne azotany, znalazły bezpośrednie zastosowanie kliniczne w leczeniu dławicy piersiowej, nadciśnienia płucnego, niewydolności serca, fibrynolizy oraz w angioplastyce wieńcowej [7, 19, 20, 21]. Pozytywny wpływ nitrogliceryny w połączeniu z flurbiprofenem zaobserwowano również w proce-

sie leczenia oparzeń [22]. Podczas oparzenia następuje zakrzepica i okluza naczyń krwionośnych tkanki skórnej w miejscu kontaktu z energią cieplną, z czym wiąże się niedokrwienie tego obszaru. Zastosowanie kombinacji powyższych leków pozwoliło na wyeliminowanie tego niekorzystnego zjawiska [22]. Istotnym utrudnieniem długotrwałej terapii organicznymi azotanami, jak np. nitrogliceryna, jest stopniowy wzrost tolerancji, czemu towarzyszy spadek stężenia cGMP [5, 20, 21].

Udział tlenu azotu w procesach zapalnych organizmu

Stan zapalny jest reakcją ustroju na wywołaną infekcję. W procesie tym aktywowane przez antygeny (bakterie, wirusy, pasożyty, substancje rakotwórcze) komórki krwi (neutrofile, monocyty) oraz komórki śródbłónki naczyń krwionośnych uwalniają wiele mediatorów prozapalnych, których nadmierna ekspresja wywołuje uszkodzenie tkanek [17]. Do mediatorów tych należą liczne cytokiny, takie jak in-

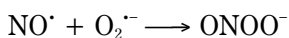


Ryc. 3. Rola NO w procesie ogniskowego niedokrwienia mózgu. **A.** W krótkotrwałej ekscytotoksyczności glutaminian oddziałuje z receptorami NMDA, powodując napływ jonów Ca²⁺ do niedotlenionych komórek, a następnie ekspresję syntazy neuronalnej nNOS i syntazy śródbłonkowej eNOS; **B.** W nadmiernej stymulacji NO może wędrować do zakończeń neuronów synaptycznych i zwiększać uwalnianie glutaminianu, co prowadzi do nekrozy lub apoptozy komórek nerwowych.

Fig. 3. The role of nitric oxide in focal cerebral ischaemia. **A.** In short-term excitotoxicity glutamate interacts with NMDA-receptors, causing Ca²⁺ ions to influx to ischemic cells, and then neuronal NOS (nNOS) and endothelial synthase (eNOS) expression; **B.** Overstimulation of NMDA may cause NO migration to the presynaptic nerve terminals and enhance glutamate release, what leads to nervous cells necrosis or apoptosis.

terleukiny: IL-1 β , IL-2, IL-6 oraz TNF- α i interferon-(1F)- γ , które stymulują krwinki białe, głównie makrofagi, do produkcji znacznych ilości NO, poprzez długotrwałą aktywację iNOS. Jednocześnie następuje indukcja oksydazy ksantynowej i oksydazy NADPH [23], a powstający anionorodnik ponadtlenkowy O₂⁻ uwalnia z komórek tucznych aktywatory selektyn (histaminę, trombinę) ułatwiające pierwszy kontakt leukocytów z komórkami śródbłonna oraz proces ich toczenia się wzdłuż naczyń. Uwalniane równocześnie aktywatory adhezji, czynnik aktywujący płytki (PAF), leukotrien B₄ (LTB₄) oraz C5A umożliwiają adhezję leukocytów do komórek śródbłonna, a następnie ich migrację do miejsca zapalnego [24].

Anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻) może ponadto w reakcji z tlenkiem azotu utworzyć wysoce toksyczny nadtlendioazotyn [23, 25]:



Ponieważ w fizjologicznych warunkach kinetyka produkcji NO różni się od kinetyki wytwarzania O₂⁻,

ilość nadtlendioazotynu wytwarzanego przez makrofagi i komórki śródbłonna jest niewielka [15]. Ponadto w warunkach fizjologicznych nadtlendioazotyn reaguje z dwutlenkiem węgla (CO₂) z tak dużą szybkością, że tylko nieliczne substancje mogą z nim współzawodniczyć w tym względzie [8, 26]. Równie lub nawet bardziej niebezpieczną dla organizmu jest, będąca rodnikiem, jego uprotonowana forma (ONOOH⁻), która w fizjologicznym zakresie pH reaguje z większością związków o wiele szybciej niż ONOO⁻ [27].

Do wzmożonego powstania nadtlendioazotynu dochodzi, gdy szybkości powstawania tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻) są takie same [8]. Zwiększoną produkcję ONOO⁻ stwierdzono w przypadku choroby Alzheimera, skazy mocznicowej, miażdżycy, uszkodzenia płuc i innych, co koreluje z obserwowanym wzrostem stężenia reaktywnych form tlenowych [26]. Reakcja ONOO⁻ z grupami -SH może powodować utlenienie tioli do disiarczków, co prowadzi do zachwiania równowagi pro- i antyoksydacyjnej komórek i dodatkowego nasilenia prooksydacyjnych uszkodzeń [28].

Uszkodzenia tkankowe obserwowane w stanach zapalnych wiążą się prawdopodobnie z działaniem nadtlenuazotynu (ONOO^-), będącego produktem reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Dlatego toksyczne efekty nadtlenuazotynu można ograniczyć, zmniejszając stężenie $\text{O}_2^{\cdot-}$ przez stosowanie enzymu rozkładającego anionorodnik ponadtlenkowy, tj. dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) lub leków hamujących oksydazę ksantynową, np. allopurinolu [23]. Taka strategia może być korzystniejsza od stosowania inhibitorów eNOS [23]. Tlenek azotu wykazuje bowiem możliwość bezpośredniego hamowania wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego przez neutrofile dzięki bezpośredniemu wpływowi na enzym generujący $\text{O}_2^{\cdot-}$, tj. oksydazę NADPH [29]. Tlenek azotu może również zmniejszać adhezję neutrofilów do komórek śródbłonnki naczyń wieńcowych. Wszystko to razem powoduje ograniczenie rozmiaru kaskady wydarzeń prowadzących do opuszczenia naczyń i migracji leukocytów do ogniska zapalnego [24]. Tlenek azotu ogranicza ponadto degranulację komórek tłuszczowych, znajdujących się w pobliżu naczyń mikrokrążenia i będących źródłem mediatorów prozapalnych [30]. Oznacza to, że NO kontroluje pierwszy etap rozwoju stanu zapalnego, którego dalszy lawinowy charakter może prowadzić do uszkodzenia tkanek [24].

Wstrząs septyczny jest stanem zaburzonej perfuzji tkankowej i charakteryzuje się biochemicznymi oznakami niedoboru tlenowego [31]. Towarzyszący temu długotrwały spadek ciśnienia tętniczego stanowi poważne zagrożenie dla życia pacjentów [17]. Teoretycznie więc, obniżenie produkcji NO we wstrząsie septycznym przez inhibitory NOS powinno zmniejszyć rozmiar uszkodzeń. Taki korzystny efekt, tj. wzrost ciśnienia tętniczego i oporu naczyniowego, był zauważalny *in vivo* po zastosowaniu inhibitora NOS — N^G -monometylo-L-argininy (L-NMMA) — u kilkunastu pacjentów w stanie wstrząsu septycznego [32]. Jednak długotrwała terapia z udziałem tego inhibitora (ponad 25 h) spowodowała w paru przypadkach nagłą śmierć. Analogiczna terapia w odniesieniu do zwierząt (owiec) w warunkach, kiedy inhibitor N^G -nitro-L-arginina (LNA) zastosowano po endotoksynie, również dawała dobre rezultaty [33]. Badania prowadzone na szczurach, którym podawano endotoksynę (LPS), wykazały ponadto pozytywny wpływ hamowania aktywności iNOS na zaznaczający się wzrost przepuszczalności jelitowej [34]. Również w nerkach szczurów wykazujących hipotensję hamowanie produkcji NO przez podawanie niespecyficznych inhibitorów powodowało wzrost ciśnienia tętniczego oraz wzrost przepływu i filtra-

cji krwi [35]. Efekt ten był zależny od stosowanych dawek inhibitora, niskie dawki normalizowały ciśnienie tętnicze, podczas gdy wysokie zmniejszały przepływ krwi [36]. Natomiast długotrwałe stosowanie inhibitorów NO jak ester metylowy N^G -nitro-L-argininy (L-NAME) powodowało u szczurów stałe nadciśnienie tętnicze [36].

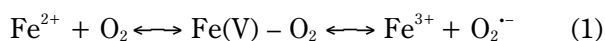
Obniżenie stężenia NO przez zahamowanie wszystkich trzech form NOS nie wpływa korzystnie na przebieg wstrząsu septycznego, a nawet powoduje zwiększenie działania szkodliwego [17, 23, 37, 38]. Niekorzystne działanie inhibitorów zarówno eNOS, jak i iNOS, jeszcze bardziej zaznacza się w sytuacji, kiedy ich podanie poprzedza moment wywołania wstrząsu, co przejawia się niedociśnieniem, skurczem naczyń krwionośnych i zwiększeniem śmiertelności zwierząt [38]. U wielu chorych na posocznice stwierdza się występowanie takich stanów patologicznych, wywołujących dysfunkcję śródbłonnki naczyń krwionośnych, jak nadciśnienie i hipercholesterolemia, a równocześnie obserwuje się zmniejszenie powstawania NO z udziałem konstytutywnej formy NOS [17]. Podawanie inhibitorów NOS w takich przypadkach może okazać się dla tych pacjentów dodatkowo niekorzystne [17].

Cytotoksyczność i cytostatyczność tlenu azotu

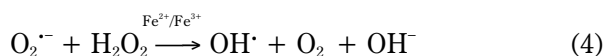
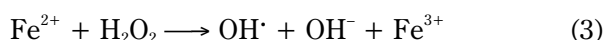
Ochronne działanie reakcji nitrozytacji

Reakcje nitrozytacji mogą w pewnych warunkach przeciwdziałać powstawaniu wolnych rodników [39]. Tlenek azotu może tworzyć kompleksy nitrozyłowe z hemoglobina i mioglobina oraz z wolnym jodem Fe^{2+} :

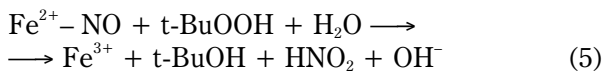
— blokując w ten sposób jony Fe^{2+} i uniemożliwiając ich udział w reakcjach (1) i (2), prowadzących do powstania $\text{O}_2^{\cdot-}$ [27] i $\cdot\text{Hb} - \text{Fe}^{4+} = \text{O}$, gdzie Hb oznacza mioglobinę lub hemoglobinę [40]:



— zapobiegając reakcji (3), prowadzącej do powstawania najbardziej niebezpiecznego rodnika hydroksylowego, określanej jako tzw. biologiczna reakcja Fentona, lub katalizowanej przez jony żelaza reakcji Habera-Weissa (4):



Dzięki reakcji nitrozylacji Fe^{2+} nie dochodzi do powstawania wolnych rodników nawet z udziałem tak silnego utleniacza, jak wodoronadtlenek tert-butyłu (5) [39].



Nitrozylacja żelaza hemowego i niehemowego uniemożliwia zatem jego udział w reakcjach prowadzących do powstawania reaktywnych form tlenu. Jest to szczególnie istotne w warunkach zmniejszonej aktywności enzymów katalizujących rozkład nadtlenu wodoru oraz innych nadtlenuków zgromadzonych na skutek wzmożonej peroksydacji w komórkach [41].

Nitrozylacja może także chronić komórki przed toksycznym działaniem produktów rozpadu wodoronadtlenków alkilowych (ROOH) — rodników alkoksylowych RO^\bullet i peroksydowych ROO^\bullet [39, 41, 42]. Tlenek azotu zarówno zapobiega akumulacji tych rodników poprzez ich wychwytywanie — patrz reakcja (6), jak i przeciwdziała peroksydacji lipidów z ich udziałem, wiążąc się z inicjującymi te reakcje metalami [39].

Toksyczne działanie tlenu azotu oraz nadtlenuazotynu

Działanie cytotoksyczne nadmiaru NO może następować poprzez bezpośrednią nitrozylację grup $-\text{SH}$ białek, hemu i kationów żelaza niehemowego oraz reszt tyrozylowych w białkach [39]. Tlenek azotu może być także promotorem powstawania karcenogennych nitrozoamin, a N-nitrozylacja pierwszorzędowych aryloamin nukleotydów przez NO prowadzi do działania mutagennego [15, 43]. Również, będący rodnikiem dwutlenek azotu (NO_2^\bullet), produkt bezpośredniego utlenienia NO, wywołuje zmiany mutagenne [43]. Uszkodzenia łańcucha DNA i zaburzenie procesów replikacji i transkrypcji, stanowią wczesną fazę rozwoju nowotworu. Tlenek azotu może przyczynić się do rozwoju procesu nowotworowego również przez obniżenie odpowiedzi immunologicznej i indukcję angiogenezy; może także brać udział w procesie powstawaniu przerzutów [44, 45]. Immunosupresyjne działanie NO polega na obniżeniu proliferacyjnej odpowiedzi limfocytów na mitogeny lub przeciwciała [43]. Wśród licznych prac dotyczących roli NO w procesie nowotworowym występują prace wskazujące na jego działanie zarówno hamujące, jak i stymulujące ten proces [46].

Synteza NO w makrofagach w odpowiedzi na specyficzny antygen wywołuje niespecyficzną cytotoksyczność przeciwko bakteriom, pierwotniakom i komórkom nowotworowym [17]. W mechanizmie

tym prawdopodobnie toksyczną rolę odgrywa działanie nadtlenuazotynu (ONOO^-), a także nitrozylacja wywołująca zahamowanie aktywności enzymów żelazowo-siarkowych mitochondrialnego łańcucha oddechowego [15]. Ponadto NO poprzez S-nitrozylację, a następnie ADP-rybozylację hamuje aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, co prowadzi do zahamowania glikolizy i spadku stężenia ATP w komórkach [47]. Może wywoływać również inaktywację dehydrogenazy bursztynianowej [29] oraz ferrochelatazy katalizującej wprowadzenie Fe^{2+} do protoporfiryny [15]. Nadtlenuazotyn może ponadto hamować syntezę ATP przez inhibicję akonitazy, kluczowego enzymu w cyklu kwasu cytrynowego [13]. Zatem cytotoksyczne działanie NO i ONOO^- wiąże się z zahamowaniem aktywności najbardziej istotnych dla prawidłowego metabolizmu komórki enzymów.

Rola tlenu azotu w procesie niedokrwienia

Niedokrwienie jest procesem związanym z nagłym zahamowaniem przepływu krwi w wyniku nagłego skurczu lub zwężenia naczyń. Towarzyszy temu zaburzenie funkcji łańcucha oddechowego, a w konsekwencji spadek stężenia ATP w komórkach [48]. Stężenie to nie ulega odnowieniu w okresie reperfuzji, gdyż na tym etapie dochodzi do powstawania reaktywnych form tlenowych powodujących degranulację komórek tucznych i uwolnienie cytokin aktywujących iNOS [24] (ryc. 2). Jednocześnie spada stężenie NO wytwarzanego przez komórki śródbłonnka naczyń krwionośnych prawdopodobnie na skutek hamowania eNOS przez $\text{O}_2^{\bullet-}$ lub poprzez reakcję NO z $\text{O}_2^{\bullet-}$. Towarzyszy temu obniżenie przepływu krwi i relaksacji naczyń krwionośnych, co łącznie z uwalnianiem prozapalnych mediatorów powoduje rozwój stanu zapalnego mikronaczyń [49].

Fakt, że uszkodzenia niedokrwienne powstają dopiero podczas reperfuzji, a nie bezpośrednio podczas niedotlenienia, a także pozytywny wpływ dysmutazy ponadtlenkowej na usuwanie skutków reperfuzji wskazują raczej na toksyczne działanie $\text{O}_2^{\bullet-}$ lub innych reaktywnych form tlenu niż NO w tym procesie [49].

Zmniejszenie produkcji NO przez śródbłonek naczyń krwionośnych niedokrwionego obszaru w pierwszych minutach reperfuzji i towarzyszący jej wzrost ciśnienia krwi, a następnie adhezja i infiltracja leukocytów potwierdzają pozytywną rolę eNOS w niedotlenieniu-reperfuzji [24]. Tlenek azotu może działać jak prosty antyoksydant usuwający $\text{O}_2^{\bullet-}$ i hamujący na tej drodze rozwój procesu zapalnego [24]. Sekwencja wydarzeń może być jednak odwrotna

— nagły wzrost stężenia NO na skutek zwiększenia dopływu tlenu w początkowej fazie reperfuzji, a następnie spadek związany z dodatkową produkcją $O_2^{\cdot-}$ przez oksydazę NADPH infiltrujących w późniejszym etapie leukocytów. Enzym ten może być jednakże inaktywowany przez NO. Zatem poza zmiataniem, NO może również hamować wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$, a w konsekwencji rozwój stanu zapalnego [49].

Bezpośrednim dowodem na korzystne działanie NO (niezwiązanego z iNOS) jest wzrost przeżywalności zwierząt poddanych eksperymentalnemu niedotlenieniu i reperfuzji, którym podano egzogeny NO (w postaci zakwaszonego roztworu $NaNO_2$) [50].

Przeprowadzone przez Iadocolę badania związane z przejściowym ogniskowym niedokrwieniem mózgu wykazały w początkowym okresie (< 2 h) pozytywny wpływ NO [51]. Korzystne działanie NO polegało na rozszerzeniu naczyń, hamowaniu agregacji płytek i wzroście przepływu krwi do obszaru wykazującego ryzyko udaru [51].

Ponadto donory NO wykazują działanie neuroprotekcyjne w procesie reperfuzji, co może się wiązać z blokadą receptorów NMDA z udziałem NO lub cGMP [52].

W warunkach długotrwałego niedokrwienia NO, powstający w wyniku aktywacji iNOS przez cytokiny, może powodować uszkodzenie kompleksu I i II łańcucha oddechowego [49]. Kröncke uważa, że pod wpływem NO najpierw następuje zahamowanie oksydazy cytochromu c w wyniku nitrozylacji hemu [15]. Powoduje to zahamowanie przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym, a w konsekwencji zwiększenie syntezy $O_2^{\cdot-}$ (ryc. 3). Powstający równocześnie ONOO⁻ może także hamować mitochondrialną dysmutazę [15], co dodatkowo zwiększa wytwarzanie wolnych rodników, uszkodzanie mitochondriów w niedotlenionych komórkach [15].

Badania prowadzone na niedokrwionych nerwach wykazały, że dodatek argininy, substratu dla śródbłonkowej syntazy NO, dodatkowo jeszcze może zwiększyć obszar uszkodzeń wywołanych przez peroksydację lipidów membranowych [53].

Tlenek azotu, produkowany przez nNOS oraz iNOS, odgrywa również niekorzystną rolę w procesie niedotlenienia i reperfuzji w tkance mózgowej. Dowodem tego jest fakt, że podanie niskich dawek (< 1 mg/kg) niespecyficznego inhibitora syntazy NO (LNA) powoduje znaczne zmniejszenie rozmiaru uszkodzenia mózgu [54]. Równoczesne podanie LNA i zmiatacza $O_2^{\cdot-}$, tj. kwasu di-tert-butylo-hydroksy-benzoowego, powoduje znaczącą redukcję toksycznych zmian. Potwierdza to jednoczesny udział NO i $O_2^{\cdot-}$, czyli powstawanie ONOO⁻ w uszkodzeniach związa-

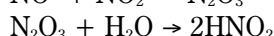
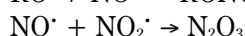
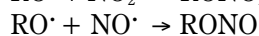
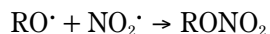
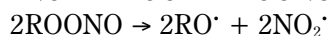
nych z niedotlenieniem. Istotnie, zarówno NO, jak i $O_2^{\cdot-}$, pochodzący z aktywowanych leukocytów mogą przez ONOO⁻ zostać wciągnięte w kaskadę uszkodzeń wywołanych niedokrwieniem [54, 55]. Podczas ogniskowego niedotlenienia mózgu, związanego z okluzją tętnicy środkowej mózgu, obserwuje się ekscytotoksyczność glutaminianową i wzrost stężenia jonów wapnia w niedokrwionych komórkach (ryc. 3A). Wraz ze wzrostem stężenia Ca^{2+} w ciągu 20 min wzrasta również stężenie NO (produkowanego przez nNOS) do poziomu mikromolowego, a następnie spada z powodu zmniejszonej dostępności substratu [56]. W wyniku szoku tlenowego towarzyszącego procesowi reperfuzji następuje przekształcenie dehydrogenazy ksantynowej w wytwarzającą reaktywne formy tlenu oksydazę ksantynową (ryc. 3). Uwolnione przez komórki tuczne i neutrofile cytokiny zapalne (TNF- α , IL-1 β , IL-6) wywołują ekspresję cząstek adhezyjnych (ICAM-1, ELAM-1, P-selektyn), co w konsekwencji prowadzi do adhezji i infiltracji leukocytów [54, 57] (ryc. 2). Jednocześnie cytokiny mogą wywoływać ekspresję iNOS w komórkach zapalnych i naczyniach mikrokrazenia [51].

Modulowanie poziomu tlenu azotu jako mechanizm przeciwdziałający niedokrwieniu

Badania przy użyciu niespecyficzných inhibitorów NOS (tzn. działających na wszystkie formy NOS) wykazały ich zróżnicowany wpływ na przebieg procesu niedotlenienia i reperfuzji. Wysokie dawki inhibitorów NOS pogłębiały uszkodzenia, natomiast niskie działały ochronnie [57]. Prawdopodobnie brak neuroprotekcyjnego działania inhibitorów NOS stosowanych w wysokich dawkach był efektem całkowitego zahamowania biosyntezy naczyniowego NO [57]. Lepsze rezultaty obserwuje się w przypadku specyficznych inhibitorów, działających tylko na nNOS lub iNOS, takich jak: 7-nitroindazol lub S-metylo-izotioureido-L-norwalina [57]. Podobnie aminoguanidyna (AG), inhibitor iNOS, osłabia poniedokrwinną aktywność iNOS i redukuje rozmiar uszkodzeń po okluzji tętnicy środkowej mózgu, nie wpływając na eNOS, czyli na ciśnienie tętnicze i przepływ mózgowy [57]. Wyniki tych badań nasuwają przypuszczenia, że aktywność iNOS i nNOS w niedokrwieniu mózgu może być szkodliwa, natomiast aktywność eNOS może działać ochronnie. Inne badania prowadzone we wczesnym stadium niedokrwienia wykazały pozytywny efekt zwiększonego przepływu krwi na skutek podawania substratu do produkcji NO: L-argininy [57]. Późniejsze podanie inhibitora (po 4 h od reperfuzji) nie daje już takiego rezultatu najprawdopodobniej na skutek całkowitego zahamowania eNOS przez $O_2^{\cdot-}$ [50].

Antyoksydacyjne działanie tlenu azotu

Tlenek azotu może reagować z różnymi związkami, głównie zawierającymi niesparowane elektrony, takimi jak anionorodnik ponadtlenkowy, dlatego może być traktowany jako zmiatacz reaktywnych form tlenu [58]. Tlenek azotu hamuje peroksydacyjne uszkodzenia przez oddziaływanie z wolnymi rodnikami powstającymi w procesach peroksydacji lipidów w cyklu łańcuchowych reakcji [58], wyrażonych równaniami (6):



Na podkreślenie zasługuje fakt, że przy tych samych stężeniach NO skuteczniej od tokoferolu (witaminy E) hamuje peroksydację lipidów [58]. Tak więc biologiczne stężenia NO (1–2 μM), jakie mogą lokalnie występować w warunkach stanu zapalnego, mogą skutecznie działać antyoksydacyjnie *in vivo* [58]. Jednakże równoczesne powstawanie $\text{O}_2^{\cdot -}$ może ograniczać antyoksydacyjne działanie NO poprzez zmniejszanie jego stężenia oraz wytwarzanie prooksydacyjnego ONOO⁻ [59], zatem ostateczny efekt będzie zależał od dostępności $\text{O}_2^{\cdot -}$ [58].

Działanie ochronne NO może także wiązać się z podwyższeniem stężenia glutationu w komórkach fibroblastów poprzez aktywację jego syntezy [29]. Prawdopodobnie następuje to dzięki wzrostowi aktywności pod wpływem donorów NO syntetazy γ -glutamyl-cysteinowej poprzez oddziaływanie donorów NO z grupami –SH w centrum aktywnym enzymu [29].

Rola tlenu azotu jako neuroprzekaźnika

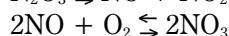
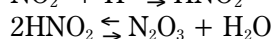
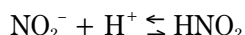
Tlenek azotu w odróżnieniu od innych neuroprzekaźników nie jest przechowywany w pęcherzykach synaptycznych i nie jest również uwalniany podczas kontaktu z błoną synaptyczną [59]. Nie oddziałuje także na receptory błony postsynaptycznej, a w czasie dyfuzji z cytoplazmy zakończeń nerwowych do przestrzeni postsynaptycznej jedynym jego receptorem jest żelazo hemowe cykazy guanylanowej [59]. Działanie NO zależy od takich neuroprzekaźników jak glutaminian i asparaginian, które wiążą się z glutamatergicznymi receptorami

N-metylo-D-asparaginowymi (ryc. 3) (NMDA) [60]. Stymulacja receptorów NMDA (ryc. 3A) otwiera kanały, przez które jony wapnia są doprowadzane do komórek mózgowych i, wiążąc się z kalmoduliną, aktywują nNOS [7, 59, 61]. W wyniku długotrwałej stymulacji przez NO włókien zstępujących i równoległych w mózdku, następuje osłabienie transmisji z włókien równoległych do komórek Purkiniego, ponadto NO jest mediatorem hipokampalnego długotrwałego wzmocnienia [59]. Tlenek azotu poprzez wywoływanie długotrwałego wzmocnienia receptorów NMDA uczestniczy w procesach uczenia się i pamięci [59]. Uwolniony z zakończeń nerwów postsynaptycznych NO może dyfundować do zakończeń nerwów presynaptycznych, powodując wzrost uwalniania glutaminianu i stymulacji receptorów NMDA, a w konsekwencji wzrost przewodnictwa synaptycznego [7]. Ponadto NO pełni rolę neuroprzekaźnika nonadrenergiczno-noncholinergicznego (NANC) w układzie pokarmowym, uczestnicząc w fizjologicznej relaksacji jelit podczas procesu trawienia, a substancje uwalniające NO relaksację tę nasilają [59].

Nadmierna stymulacja receptorów NMDA prowadzi do apoptozy i nekrozy. Zahamowanie łańcucha oddychania mitochondrialnego przez nadmiar NO powoduje spadek stężenia ATP, a w konsekwencji zaburzenie działania pomp jonowych, obniżenie potencjału błony mitochondrialnej i otwarcie zależnych od napięcia kanałów jonowych [61]. Wraz z dodatkowym napływem jonów wapnia, do wnętrza komórek nerwowych wnikają jony potasu oraz cząsteczki wody, powodujące pęcznienie komórek, lizę i nekrozę [61]. Ponadto NO, syntetyzowany i uwalniany w nadmiernym stężeniu, zabija neurony, których włókna kontaktują się z neuronami wykazującymi aktywność NOS [59]. Natomiast w przypadku mniej drastycznego pobudzenia receptorów NMDA dochodzi do zaprogramowanej śmierci neuronów — apoptozy [62].

Znaczenie i powstawanie tlenu azotu w reakcjach nieenzymatycznych

W środowisku kwaśnym lub redukującym NO może powstawać nieenzymatycznie z azotynów, a pośrednio także z azotanów dostarczanych w zielonych warzywach, z udziałem bakterii jamy ustnej. W niskim pH w kolejnych reakcjach następuje redukcja azotynów do NO [63]:



Czynniki redukujące, głównie kwas askorbinowy mogą zwiększać wytwarzanie NO w wodnych roztworach poprzez szybką redukcję kwasu azotowego [63].

W niedokrwionym sercu wzrost stężenia NO nie wiąże się wyłącznie z syntazą NO, lecz może być także wynikiem oddziaływania środowiska redukującego [64]. Tlenek azotu wytwarzany nieenzymatycznie z azotynów powoduje uszkodzenie mięśnia sercowego, co przejawia się zmniejszoną kurczliwością [64].

Zawarte w pocie azotany mogą być nieenzymatycznie redukowane do azotynów przez występujące na skórze drobnoustroje, a następnie, w kwaśnym środowisku potu, do NO [65].

W soku żołądkowym w procesach nieenzymatycznej redukcji NO jest wytwarzany w sposób ciągły. W niedokwasocie, kiedy stężenie kwasu solnego w środowisku żołądka spada, wytwarzanie na tej drodze NO znacznie się obniża [63]. Natomiast przy stosowaniu diety niskoazotanowej następuje wchłanianie azotanów z osocza przez gruczoły śliniankowe i redukcja do NO [63]. Stężenie NO w żołądku jest znacznie wyższe od tego, jakie uważa się za niezbędne do relaksacji naczyń. Dzięki temu NO może lokalnie wykazywać działanie bakteriostatyczne, a także uczestniczyć w regeneracji śluzówki i regulacji przepływu krwi przez śluzówkę żołądka [63, 66]. Ma to istotne znaczenie dla tego narządu w eliminowaniu niekorzystnych skutków niedokrwienia oraz uszkodzeń śluzówek spowodowanych nadkwasotą.

Podczas infekcji dróg moczowych w moczu pojawiają się azotyny, zwane też wskaźnikami infekcji, będące produktami redukcji azotanów przez bakterie [63]. Dlatego podawanie witaminy C powoduje ich dalszą redukcję z uwolnieniem NO, co może hamować rozwój bakterii [67, 68].

Chociaż rola NO wytwarzanego nieenzymatycznie nie jest dokładnie poznana, jego działanie w żołądku, sercu, układzie moczowym i skórze wskazuje jednak na znaczne podobieństwo w biologicznym działaniu do NO wytwarzanego na drodze enzymatycznej.

Wnioski

Tlenek azotu uczestniczy w ważnych procesach fizjologicznych, takich jak regulacja przepływu i ciśnienia krwi, regulacja hormonalna, neurotransmisja, a także w stanach patologicznych: stanach zapalnych, procesach oksydacyjno-redukcyjnych, procesach niedokrwienia i reperfuzji oraz innych.

We wszystkich procesach patologicznych NO spełnia podwójną rolę w zależności od miejsca i ilo-

ści jego wytwarzania, a więc formy enzymu uczestniczącego w jego syntezie, czasu trwania tego procesu, dostępności substratów i inhibitorów, pH, a także od obecności w komórkach substancji o działaniu anty- i prooksydacyjnym.

Wydaje się, że fizjologiczne stężenie NO wytwarzanego przez eNOS oraz przejściowe pobudzenie wytwarzania NO przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, do którego dochodzi pod wpływem wzrostu naprężenia ścinającego, krótkotrwałego niedokrwienia lub krótkotrwałej stymulacji receptorów NMDA — odgrywa pozytywną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek i adaptacji organizmu do zmienionych warunków.

Nadmierna produkcja NO zarówno przez nNOS, jak i iNOS, może natomiast prowadzić do procesów degeneracyjnych — głównie na skutek uszkodzania tkanek przez silnie utleniający i nitrozylujący, toksyczny anion nadtlenoazotynowy.

Piśmiennictwo

1. Leńkowa A. Chmury nad miastem. W: Oskąpowana ziemia. PAN 1961.
2. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376.
3. Marletta M. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *TIBS* 1989; 14: 1488–1492.
4. Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A. i wsp. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 444–448.
5. Ignaro L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb. J.* 1989; 3: 31–36.
6. Beckman J. Biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite. W: Kubes P. wyd. *Nitric Oxide: A modulator of cell-cell interactions in the microcirculation*, R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA 1995: 1–18.
7. Moncada S., Higgs A.E. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 2002–2012.
8. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochem. Biophys. Acta* 1999; 1411: 273–289.
9. Garay R.P. Cellular mechanisms of smooth muscle contraction. *Rev. Mal. Respir.* 2000; 17: 531–533.
10. Li P.L., Jin M.W., Campbell W.B. Effect of selective inhibition of soluble guanylyl cyclase on the K(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle. *Hypertension* 1998; 31: 303–308.
11. Pohl U., de Vitt C. A unique role of NO in the control of blood flow. *News Physiol. Sci.* 1999; 14: 74–80.
12. Weideldt T., Boldt W., Markwardt F. Acetylcholine-induced K⁺ current in smooth muscle cells of intact rat small arteries. *J. Physiol.* 1997; 500: 617–630.

13. Chang Y.S., Yaccino J.A., Lakshminarayanan S., Frangos J.A., Tarbell J.M. Shear-induced increase in hydraulic conductivity in endothelial cells is mediated by a nitric oxide dependent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20 (1): 35–42.
14. Ruetten H., Zabel U., Linz W., Schmidt H.H. Downregulation of soluble guanyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 1999; 85 (6): 534–541.
15. Kröncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection — How, Why, When, and Where? *Nitric Oxide: Biol. and Chem.* 1997; 1: 107–120.
16. Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell. Moll. Life Sci.* 1997; 53: 576–582.
17. Kirkebøen K.A., Strand Ø.A. The role of nitric oxide in sepsis — an overview. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1999; 43: 275–288.
18. Nakayama M., Kawaguchi Y., Numata M., Hagesawa T., Hosoya T. Role of nitric oxide in hypotension during hemodialysis. *Nephron* 1998; 79: 490–491.
19. Kukovetz W.R., Holzman S., Wurm A., Poch G. Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1979; 310 (2): 129–138.
20. Ratz J.D., McGuire J.J., Anderson D.J., Bennett B.M. Effects of flavoprotein inhibitor, diphenyleneiodonium sulfate on ex vivo organic nitrate tolerance in the rat. *J. Pharmacol. Exper. Therapeutics* 2000; 293: 569–576.
21. Marsh N., Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin. Experimen. Pharmacol. Physiol.* 2000; 27: 313–319.
22. Gorman P.J., Siggers G., Ehrlich P., Mackay D.R., Graham W.P. Effects of topical nitroglycerin and flurbiprofen in the rat comb burn model. *Ann. Plast. Surg.* 1999; 42 (5): 529–532.
23. Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)* 1998; 63: 845–865.
24. Kubes P. Nitric Oxide: A homeostasis regulator of leukocyte–endothelial cell interaction, RG Lands Company, Austin, Texas, USA 1995: 19–41.
25. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murder, and medicine. *The Lancet* 1994; 343: 1199–1206.
26. Squadrito G.L., Pryor W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biol. Med.* 1998; 39: 292–403.
27. Bartosz G. Część 1: Strategia ataku w Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN 1995; 53–54, 76, 82–83.
28. Valasserg G.T. Oxidation of vitamin E, vitamin C and thiols in rat brain synaptosomes by peroxynitrite. *Biochem. Pharmacol.* 1996; 52: 579–586.
29. White A.C., Maloney E.K., Boustani P.M., Hassoun P.M., Barry L.F. Nitric oxide increases cellular glutathione levels in rat lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 442–448.
30. Kimura M., Mitani H., Bando M.H., Totsuka T., Hayashi S. Mast cell degranulation in rat mesenteric venule: effects of L-NAME, methylene blue and ketotifen. *Pharmacol. Res.* 1999; 39 (5): 397–402.
31. Galignina M.D., Piwien-Pilipuk G., Assreuy J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 317–323.
32. Petros A., Lamb G., Leone A., Moncada S., Bennett D., Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc. Res.* 1994; 28 (1): 34–39.
33. Lorente J.A., Landin L., Renes E., De Pablo R., Jorge P., Rodena E. Liste D. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit. Care Med.* 1993; 21 (5): 756–767.
34. Boughton-Smith N.K., Evans S.M., Laszlo F., Whittle B.J., Moncada S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110: 1189–1195.
35. Liberthal W., McGarry A.E., Sheils J., Valeri C.R. Nitric oxide inhibition in rats improves blood pressure and renal function during hypovolemic shock. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: F868–F872.
36. Fenoy F.J., Ferrer P., Carbonell L., Garcia-Salom M. Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis. *Hypertension* 1995; 25 (3): 408–414.
37. Minnard E.A., Shou J., Naama H., Cech A., Gallagher H., Daly J.M. Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch. Of Surgery* 1994; 129 (2): 142–147.
38. Wright C.E., Rees D.D., Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc. Res.* 1992; 26 (1): 48–57.
39. Gorbunov N.V., Yalowich J.C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V.B., Kisin E. i wsp. Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 12328–12341.
40. Kanner J., Harel S., Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; 289: 130–136.
41. Gorbunov N.V., Tyurina Y.Y., Salama G., Day B.W., Claycomp H.G., Arggros G. i wsp. Nitric oxide protects cardiomyocytes against tert-butyl hydroperoxide-induced formation of alkoxyl and peroxy radicals and peroxidation of phosphatidylserine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1998; 244: 647–651.
42. Wink D.A., Cook J.A., Krishna M.C. Nitric oxide protects against alkyl peroxide mediated cytotoxicity: further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 319: 402–407.

43. Ohshima H., Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mut. Res.* 1994; 305: 253–264.
44. Mochhala S., Rajnakova A. Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Rad. Res.* 1999; 31 (6): 671–679.
45. Wink D.A., Vodovotz Y., Laval Y.F., Dewhirst M.W., Mitchell J.B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19 (5): 711–721.
46. Brennan P.A., Downie I.P., Langton J.D., Zaki G.A. Emerging role of nitric oxide in cancer. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 1999; 37 (5): 370–373.
47. Molina y Vedia L., McDonald B., Reep B., Brune B., Di Silvio M., Billiar T.R., Eduardo G.L. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 24929–24932.
48. Abe K., Hayashi N., Terada H. Effect of endogenous nitric oxide on energy metabolism of rat heart mitochondria during ischemia and reperfusion. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 26: 379–387.
49. Kubes P. Nitric oxide modulates leukocyte function in ischemia reperfusion. W: Kubes P. wyd. *Nitric Oxide: a modulator of cell-cell interactions in the microcirculation*. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA 1995; 101–126.
50. Aoki N., Johnson G., Lefer A.M. Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splachnic artery occlusion shock. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: G275–G281.
51. Iadecola C., Zhang F., Casey R., Clark H., Brent, Ross M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1373–1380.
52. Verrecchia C., Buisson A., Lakhmebhe N., Plotkine M., Boulu R.G. Nitric oxide and cerebral ischemia. *Ann. New York Academy of Science*, 341–347.
53. Cristol J.P., Thiemerman C., Guerin M.C., Toreilles J., Crastes de Paulet A.J. Lipid Mediators. *Cell Signalling* 1995; 13: 9–13.
54. Spinnewyn B., Cornet S., August M., Chabrier P.E. Synergistic protective effects of antioxidants and nitric oxide synthase inhibitor in transient focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1999; 19: 139–143.
55. Braughler J.M., Hall E.D. Central nervous system trauma and stroke. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 1989; 6 (3): 289–301.
56. Maliński T., Bailey F., Zhang Z.G., Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Flow & Metabolism* 1993; 13: 355–358.
57. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 132–139.
58. O'Donnel V.B., Chumley P.H., Hogg N., Bloodsworth A., Darley-Usmar V.M., Freeman B.A. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation. Kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with tocopherol *Biochemistry* 1997; 36: 15216–15223.
59. Snyder S.H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science* 1992; 257: 494–496.
60. Brett D.S., Snyder S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cyclic GMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 9030–9033.
61. Kamińska B., Stańczyk M. Molekularne mechanizmy neurodegeneracyjne. *Postępy Biologii Komórki* 1998; 25: 15–27.
62. Bonfoco E., Kraine D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:7162–7166.
63. Weitzberg E., Lundberg J.O.N. Nonenzymatic Nitric Oxide Production in Humans. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 1998; 2: 1–7.
64. Zweier J.L., Wang P., Samouilow A., Kupussamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature Medicine* 1995; 1; 804–809.
65. Weller R., Patullo S., Smith L., Golden M., Ormerod A., Benjamin N. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *Journal of Invest. Dermatol.* 1996; 107: 327–331.
66. Brown J.F., Hanson P.J., Whittle B.J. Nitric oxide donors increase mucus thickness in rat stomach. *Europ. J. Pharmacol.* 1992; 223: 104–104.
67. James G.P., Paul K.L., Fuller J.B. Urinary nitrite and urinary-tract infection. *Amer. J. Clin. Pathol.* 1978; 70 (4): 671–678.
68. Lundberg J.O., Carlsson S., Engstrand L., Morcos E., Wiklund N.P., Weitzberg E. Urinary nitrite: more than a marker of infection. *Urology* 1997; 50 (20): 189–191.